

Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en viveros de cítricos de Masaya, Nicaragua

Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and population fluctuation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in citrus nurseries in Masaya, Nicaragua

Carlos Joel Melgara Maradiaga¹, Jorge Ulises Blandón Díaz²

MSc en Sanidad Vegetal. Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), Nicaragua. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9207-6982> / cmelgara@oirsa.org

PhD. en Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7904-8853> / ulisesdb@ci.una.edu.ni

Autor de correspondencia: ulisesdb@ci.una.edu.ni



RESUMEN

La producción de cítricos en Nicaragua es de importancia económica ya que genera divisas al país y además esta industria genera empleos directos e indirectos. Sin embargo, las áreas citricolas están amenazadas por la enfermedad conocida como huanglongbing (HLB), la cual es transmitida por el psílido *Diaphorina citri*. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo principal generar información relacionada con la detección del agente causal del HLB (*Candidatus Liberibacter asiaticus* – CLAs) y la fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* en cuatro viveros de cítricos del departamento de Masaya, Nicaragua. Durante cuatro meses se realizó la detección del agente causal del huanglongbing a través de la técnica de PCR, se determinó la fluctuación poblacional del vector y el efecto del uso de insecticidas sobre la fluctuación poblacional del insecto. En el estudio de fluctuación poblacional se usaron trampas amarillas, las cuales se revisaron a intervalos de ocho días. Se detectó al agente causal del huanglongbing en los cuatro viveros. Los tres estadios del psílido se presentaron durante el periodo de estudio. Los mayores picos poblacionales de los adultos se presentaron en abril, coincidiendo con altas temperaturas y bajas precipitaciones. La variante CLAs es la que estuvo presente en los cuatro viveros. La fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* por vivero fue variable a través del tiempo. Los picos poblacionales más altos se observaron en el mes de abril. Las aplicaciones de insecticidas redujeron las poblaciones de *Diaphorina citri* en cada uno de los viveros.

Palabras clave: Huanglongbing, psílido asiático de los cítricos, trampas amarillas, PCR.

ABSTRACT

Citrus production in Nicaragua is of great economic importance since it generates foreign currency for the country and this industry also generates direct and indirect jobs. However, citrus areas are threatened by the disease known as huanglongbing (HLB), which is transmitted by the psyllid *Diaphorina citri*. Therefore, the main objective of this research was to generate information related to the detection of the causative agent of HLB (*Candidatus Liberibacter asiaticus* – CLAs) and the population fluctuation of *Diaphorina citri* in four citrus nurseries in the department of Masaya, Nicaragua. For four months, the detection of the causative agent of huanglongbing was carried out through the PCR technique, the vector population fluctuation, and the effect of insecticide usage on the insect population fluctuation were determined. In the study of population fluctuation yellow traps were used, which were checked at 8-day intervals. The causal agent of huanglongbing was detected in the four nurseries. All three stages of the psyllid occurred during the study period. The highest population peaks of adults occurred in April, coinciding with high temperatures and low rainfall. The CLAs variant is the one that was present in the four nurseries. The population fluctuation of *Diaphorina citri* by nursery was variable over time. The highest population peaks were observed in the month of April. Insecticide applications reduced the populations of *Diaphorina citri* in each of the nurseries.

Keywords: Huanglongbing, Asian citrus psyllid, yellow traps, PCR.

CIENCIA DE LAS PLANTAS

El enverdecimiento de los cítricos o Huanglongbing (HLB) es la enfermedad más devastadora en muchas áreas productoras de cítricos en todo el mundo (Luo *et al.*, 2017; Wang, 2020). El HLB es causado por una alfa-proteobacteria no cultivable, Gram negativa restringida al floema de la planta y de la cual se conocen tres especies, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf), y *Ca. L. americanus* (CLam) (Merfa *et al.*, 2019). Entre estas especies, CLas es la que está más ampliamente distribuida y se ha encontrado en Asia, América del Norte, América del Sur y África, CLaf solo está presente en África y CLam, que se identificó inicialmente en Brasil, está disminuyendo y siendo desplazada por CLas. CLas y CLam son transmitidas por el psílido asiático de los cítricos [(PAC), *Diaphorina citri*] y CLaf por el psílido africano de los cítricos [(PAfC), *Trioza erythrae*] (Wang, 2020).

El HLB se caracteriza por síntomas como el moteado de las hojas, la clorosis asimétrica y el amarillamiento de las nervaduras secundarias y centrales, que se asemejan a ciertas deficiencias nutricionales. Los árboles infectados producen menos frutos que son pequeños, torcidos, de sabor amargo y, a veces, permanecen de color verde (Bové, 2006). El monitoreo regular de las poblaciones del PAC y los síntomas de HLB es esencial para el manejo exitoso del psílido y la enfermedad. Actualmente, la mayoría de los productores manejan *D. citri* con insecticidas que se aplican de forma calendarizada porque no hay cura para la enfermedad y las prácticas de manejo aún dependen de insecticidas para el control debido a los efectos rápidos y visibles sobre la mortalidad del insecto vector (Boina y Bloomquist, 2015; Leong *et al.*, 2022; Qureshi *et al.*, 2014).

El monitoreo de PAC debe hacerse durante todo el año, pero es más importante en la estación seca y debe comenzar tan pronto como aparezcan nuevos brotes en los árboles. Se recomiendan trampas adhesivas amarillas para determinar la presencia y la abundancia de los adultos dentro de las plantaciones y el movimiento de adultos desde lugares adyacentes a las plantaciones de cítricos. Las trampas son más atractivas cuando no hay brote de hojas jóvenes, especialmente después de que el brote se ha endurecido, y son más efectivas en la estación seca que en la estación lluviosa. Se ha estimado que es suficiente colocar cuatro trampas por hectárea, ya que el número requerido para monitorear efectivamente la actividad de vuelo del PAC varía desde 30 m en plantaciones < 2 ha, hasta 150 m en plantaciones más grandes (Leong *et al.*, 2011; Leong *et al.*, 2022).

En el caso del HLB se recomienda revisar todos los árboles en la plantación al menos siete veces al año, cuatro veces en la estación lluviosa y tres veces en la estación seca, para detectar síntomas foliares de la enfermedad. La inspección visual de los árboles por parte de personal

capacitado es una de las formas más utilizadas para detectar árboles con síntomas de HLB (Keremane *et al.*, 2015). La prueba de yodo-almidón también se utiliza para evaluar la acumulación de almidón en hojas sintomáticas. La técnica es barata y rápida, sin necesidad de equipos sofisticados (Etxeberria *et al.*, 2003). Sin embargo, actualmente el método más eficiente para la detección y confirmación de HLB se basa en detecciones moleculares mediante el uso de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) (Hansen *et al.*, 2008; Yzquierdo-Alvarez *et al.*, 2021).

La producción de cítricos en Nicaragua es de importancia económica ya que genera divisas al país y además esta industria genera empleos directos e indirectos. Teniendo en cuenta que el HLB y su vector *D. citri* ya han sido reportados en varios sitios de Nicaragua afectando plantaciones establecidas, la presente investigación tiene como objetivo el de generar información relacionada con la ocurrencia del agente causal del HLB (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) y el insecto vector *D. citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en viveros de cítricos en el departamento de Masaya, Nicaragua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de estudio. La detección del agente causal del HLB se realizó en el Laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria (UNA). El estudio de fluctuación poblacional del vector *D. citri* se efectuó en cuatro viveros ubicados en el municipio de Masatepe, departamento de Masaya, Nicaragua. Los sitios de los viveros seleccionados se encuentran a una altitud promedio de 455.41 metros sobre el nivel del mar (msnm) y presentan un clima tropical de sabana, con temperaturas promedios de 27.5 °C y precipitaciones anuales que oscilan entre 1 200 mm y 1 400 mm.

Recolección de las muestras para la prueba PCR. Se recolectaron muestras de hojas en cada uno de los viveros y se llevaron al laboratorio de microbiología de la UNA. Se seleccionaron hojas que presentaban síntomas típicos de la enfermedad, tales como: hojas con coloración amarillo pálido con áreas irregulares (asimétricas) de moteado difuso, con nervaduras engrosadas y aclaradas de aspecto corchoso (Coletta-Filho *et al.*, 2004). Estas hojas se utilizaron para extraerles el ADN y posteriormente realizar la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las plántulas tenían en promedio cuatro meses de edad en el momento que inició el estudio y ocho meses de edad al concluir éste. Se realizaron dieciséis recolectas de muestras en total por vivero (una muestra semanal × 4 meses) teniendo en cuenta que el patógeno tiene un largo período de incubación y de latencia (Gottwald, 2010). En cada mes por vivero, se tomaron 20 plántulas, de las cuales se tomaron las hojas con síntomas de HLB, para un total de 80 plántulas por vivero.

CIENCIA DE LAS PLANTAS

Detección del agente causal del HLB. Para la extracción de ADN de tejido foliar se siguió el procedimiento de Hung *et al.* (1999) con una leve modificación, que consistió en no usar el reactivo Sarkosyl. En un recipiente de porcelana se depositaron aproximadamente 0.5 gramos de venas centrales y pecíolos; se agregaron 3 ml de buffer de extracción de ADN y se procedió a moler los tejidos con un mortero. La suspensión resultante se incubó a 65 °C por una hora; se centrifugó a 12 000 g (13 000 rpm) durante 10 minutos; se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un nuevo tubo; se agregaron 100 µl NaCl 5M, 300 µl de CTAB al 2 % y 2 µl de ARN-asa y se mezcló uniformemente. Posteriormente se incubó a 65 °C por 10 min. Se adicionaron 600 µl de CI (cloroformo:alcohol isoamílico = 24:1) y se mezcló mediante inversión. Se centrifugó a 11 000 g (12 000 rpm) durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml. Se agregó 600 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una relación de 25:24:1 y se mezcló mediante inversión. Se centrifugó a 12 000 g (13 000 rpm) por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml y se agregó 300 µL de isopropanol frío y se mezcló por inversión suave. Se incubó a -20 °C por 30 min, para luego centrifugar a 13 000 g (14 000 rpm) por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 200 µl de etanol al 70 %. Se centrifugó nuevamente a 14 000 rpm y se descartó cuidadosamente el etanol y el precipitado se dejó secar hasta que se evaporaron los residuos de etanol. El precipitado se resuspendió en 50 µl de buffer TE. El ADN resuspendido se almacenó a 4 °C.

Una vez finalizada la extracción de ADN de las hojas se continuó con el procedimiento de la PCR convencional y electroforesis. Se utilizaron el par de iniciadores desarrollados por Hocquell *et al.* (1999), los cuales consisten en las siguientes secuencias: el iniciador de sentido rplA2 (TATAAAGGTTGACCTTTGGAGTTT) y el iniciador antisentido *rplJ5* (ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA). Este par de iniciadores permiten distinguir las variantes asiáticas y africanas, ya que amplifican un fragmento de 703 pb (pares de base) para *Ca. Liberibacter asiaticus* (CLas) y de 669 pb para *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf). Este par de iniciadores no amplifican las secuencias de la región 16S del ADN ribosomal de la bacteria, sino que están basados en genes proteicos (Operón β) (Fujikawa e Iwanami, 2012). El protocolo de amplificación que se utilizó fue el descrito por Li *et al.* (2007) con leves modificaciones, las cuales se citan a continuación. Se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C por tres minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 45 segundos, anillamiento a 53 °C por 45 segundos, extensión a 72 °C por un minuto y una extensión final de 72 °C por siete minutos. El producto PCR fue visualizado en agar al 1 %, al cual se le agregó 4 µl del reactivo GelRed para la tinción de los fragmentos de ADN.

Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri*. Se colocaron diez trampas Delta Semiotrap color amarillo y se revisaron cada ocho días durante cuatro meses, para un total de 16 fechas de muestreo, y de esta manera se determinó la fluctuación poblacional del vector. También se recolectaron brotes de las plántulas para realizar el conteo de huevos, ninfas y en algunos casos hasta de insectos adultos de *D. citri* que se encontraban en los brotes. Asimismo, la fluctuación poblacional del vector se relacionó con el número de aplicaciones de insecticidas.

Variables evaluadas. Porcentaje de detección del HLB mediante PCR en muestras de hojas por vivero; número de adultos de *D. citri* capturados por trampa; número de brotes totales por planta; número de huevos, ninfas y adultos por brote nuevo; número de aplicaciones de insecticidas.

Análisis de datos. En el caso de la detección de CLas en tejido vegetal mediante la PCR, se realizó una descripción porcentual de los casos positivos por vivero. Para el análisis de los datos de fluctuación poblacional se realizó un análisis gráfico descriptivo de la fluctuación de adultos y una correlación entre los estadios de huevo, ninfas y adultos y el número de brotes nuevos por plántula en cada vivero. En el caso específico de los adultos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) tomando como repetición las fechas de muestreo y se usó el software estadístico InfoStat (2008). Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección del agente causal del HLB. En los cuatro viveros se detectó la presencia de HLB a través de la prueba de PCR. El porcentaje de detección de *Ca. Liberibacter asiaticus* fue variable en los cuatro viveros durante los cuatro meses que se recolectaron muestras (Cuadro 1). En los viveros donde se detectaron más casos de HLB fueron en Campos Azules 1 y en el vivero El Román (cuatro casos positivos de 16 muestras analizadas mediante PCR), el porcentaje de detección en estos viveros fue de 25 %, mientras que en los viveros Campos Azules 2 y El Diamante el porcentaje fue de 12.5 %, ya que de 16 muestras analizadas en los cuatro meses se detectaron solamente dos casos positivos de HLB (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de detección de *Ca. Liberibacter asiaticus* en hojas de naranja provenientes de plántulas de cuatro viveros

Vivero	NMAPM	Detección mediante PCR				Total (%)
		Febrero	Marzo	Abril	Mayo	
Diamante	4	0/4	0/4	0/4	2/4	12.5
Campos Azules 1	4	0/4	1/4	0/4	3/4	25.0
Campos Azules 2	4	0/4	1/4	0/4	1/4	12.5
Román	4	0/4	2/4	0/4	2/4	25.0

NMAPM = Número de muestras analizadas por mes.

CIENCIA DE LAS PLANTAS

Aunque el estudio abarcó un período de cuatro meses (febrero-mayo 2017), solamente en dos meses (marzo y mayo) se detectó la presencia del agente causal del HLB en las muestras analizadas a través de PCR (Figura 1). En el mes de marzo, la enfermedad fue detectada inicialmente en muestras tomadas de los viveros Campos Azules 1 (Figura 1, Panel A, carril 2), El Román (Figura 1, Panel B, carriles 10 y 11) y Campos Azules 2 (Figura 1, Panel B, carril 12). En el mes de mayo, el HLB fue detectado en todas las muestras analizadas de los cuatro viveros. Los casos positivos de HLB se registraron en el vivero El Diamante (Figura 1, Panel C, carril 2), vivero Campos Azules 2 (Figura 1, Panel C, carril 4) y Campos Azules 1 (Figura 1, Panel C, carriles 5 y 6). En la Figura 1 (Panel D), se observan casos positivos en el vivero El Román (carriles 7 y 8), El Diamante (carril 9) y Campos Azules 1 (carril 13). Los marcadores *rplA2* (iniciador de sentido) y el *rplJ5* (iniciador de antisentido) amplificaron un fragmento de 703 pares de bases (pb), confirmando que la variante *Ca. Liberibacter asiaticus* es la que estuvo presente en los cuatros viveros donde se realizó el estudio (Figura 1). De esta manera, se descarta la posibilidad de que la variante *Ca. Liberibacter africanus* esté presente en la zona de estudio.

La región intergénica entre los genes *rplA* y *rplJ* es 34 pb más grande en *Ca. Liberibacter asiaticus* que en *Ca. Liberibacter africanus*. Con el iniciador de sentido *frplA2*, seleccionado en el gen *rplA*, y el iniciador de antisentido *r-rplJ5* del gen *rplJ*, se amplifica un fragmento de ADN de 703 pb en *Ca. Liberibacter asiaticus*, mientras que para *Ca. Liberibacter africanus* se obtiene un fragmento de ADN de 669 pb (Arredondo *et al.*, 2016; Bové, 2006).

En general, la detección del agente causal del HLB en los viveros fue errática durante el período de estudio, lo que se atribuye al hecho de que la bacteria provoca una infección sistémica difusa en los tejidos de la planta afectada. La naturaleza discontinua de la infección sistémica inducida por *Ca. Liberibacter asiaticus* indica que la concentración bacteriana en algunas partes de la planta está por debajo del umbral de detección a través de PCR, sin embargo, esas partes aparentemente negativas a la PCR pueden estar infectadas, y aunque son visualmente asintomáticas, el floema en todo el árbol o plántula tiene suficiente carga bacteriana como para que el vector, *D. citri*, pueda adquirir y transmitir al patógeno (Ding *et al.*, 2015; Gottwald, 2010).

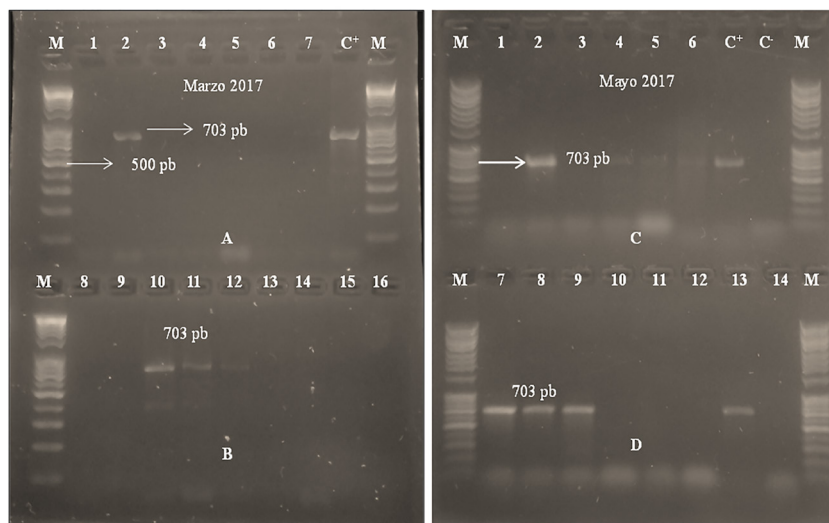


Figura 1. Detección positiva de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en marzo (Panel A y B) y mayo (Panel C y D) 2017. En el panel A, la única muestra positiva (carril 2) correspondió al vivero Campos azules 1 y en panel B, las muestras positivas corresponden al vivero El Román (carriles 10 y 11) y al vivero Campos Azules 2 (carril 12). Las demás muestras resultaron negativas. En el panel C, los casos positivos de HLB se registraron en el vivero El Diamante (carril 2), vivero Campos Azules 2 (carril 4), Campos Azules 1 (carriles 5 y 6). En el panel D, los casos positivos corresponden al vivero El Román (carriles 7 y 8), El Diamante (carril 9) y Campos Azules 1 (carril 13). C+ = control positivo, C- = control negativo y M = marcador molecular de 100 pb, A, B, C y D son los paneles.

Por un lado, se ha estimado que en plantaciones de cítricos con árboles de 7-10 años, el período de incubación es de 1 a 2.5 años. Sin embargo, en plantaciones más jóvenes, el período de incubación se estima que es de 6-12 meses (Gottwald, 2010). Existen reportes que indican que el período de latencia es de aproximadamente 15 días (Lee *et al.*, 2015). En el presente estudio, el agente causal del HLB fue detectado en plántulas injertadas de 6 y 8 meses de edad. La temprana detección de la enfermedad en las plántulas injertadas plantea dos alternativas en este estudio: i) las yemas, con las cuales se realizó el injerto estaban contaminadas con la bacteria y provenían de sitios donde la enfermedad está presente, pero todavía no está reportada oficialmente; ii) las plántulas fueron infectadas por insectos adultos de *D. citri* que portaban la bacteria.

La primera alternativa puede tener más aceptación, ya que se ha comprobado que mediante injertación los períodos de incubación y de latencia son más cortos. Por ejemplo, Ahmad *et al.* (2010) reportan que observaron síntomas de HLB a las 12-16 semanas después de haber injertado yemas infectadas con *Ca. Liberibacter asiaticus* en plántulas de mandarina de tres meses de edad. Además, algunas investigaciones en las cuales se ha hecho uso de la PCR para estudiar la capacidad de transmisión de *Ca. Liberibacter asiaticus* a través del psílido asiático de los cítricos (PAC) y a través de injerto,

CIENCIA DE LAS PLANTAS

han demostrado que el PAC tuvo porcentajes de inoculación menos exitosos en las plantas huéspedes que la inoculación a través de injerto (Ukuda-Hosokawa *et al.*, 2015).

Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri*. La fluctuación poblacional de *D. citri* por vivero fue variable a través del tiempo. Los picos poblacionales más altos se observaron en el mes de abril con 17 y 26 insectos adultos capturados en el vivero Campos Azules 1 y El Román respectivamente (Figura 2). Estos resultados muestran la presencia de *D. citri* durante todo el periodo de evaluación, lo cual concuerda con lo reportado por Alemán *et al.* (2007) quienes mencionan que el psílido no tiene diapausa (estado fisiológico de inactividad), por lo tanto, el insecto siempre estará presente y sus poblaciones declinan en los periodos en que las plantas no están en brotación. Aun reportando picos poblacionales bajos en algunas de las fechas de muestreo en cada uno de los viveros en estudio, García *et al.* (2016) plantean que el hecho de poder presentar un potencial de 16 generaciones al año hace que su nivel de daño sea alto, con el agravante de que un nivel bajo poblacional no deja de ser preocupante para un insecto que sirve como vector del HLB.

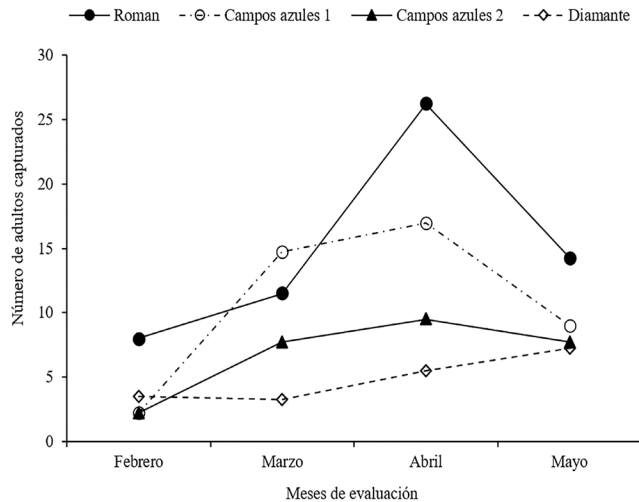


Figura 2. Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* en cuatro viveros del municipio de Masatepe, Masaya, 2017.

No se encontró correlación estadística significativa entre los tres estadios del vector y el número de brotes nuevos en cada vivero. En el vivero El Román se registró el mayor número de individuos de los tres estadios de *D. citri* con un promedio de 28 huevos, 42 ninfas y 15 adultos, mientras que el promedio más alto de brotes se registró en los viveros El Diamante y El Román con 34 cada uno (Cuadro 2). Los

resultados del presente estudio concuerdan con otros estudios donde no se ha encontrado una correlación significativa entre la densidad de adultos de *D. citri* y el número de brotes (Chávez-Medina *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Distribución numérica de brotes, huevos, ninfas y adultos de *Diaphorina citri* entre los cuatros viveros de cítricos incluidos en el estudio

Vivero	Brotes	Huevos	Ninfas	Adultos
El Diamante	34	7	15	5
Campos Azules 1	24	14	12	11
Campos Azules 2	23	7	12	7
El Román	34	28	42	15

Sin embargo, en este estudio se pudo constatar que el número de adultos tuvo una tendencia a la disminución cuando el número de brotes también disminuyó en el mes de abril (Figura 3). De tal manera, la presencia de brotes vegetativos jóvenes favorece la presencia de adultos del vector, los cuales ovipositan en estos brotes jóvenes donde posteriormente se desarrollan los huevos y ninfas, lo que también ha sido reportado por Ortega-Arenas *et al.* (2013).

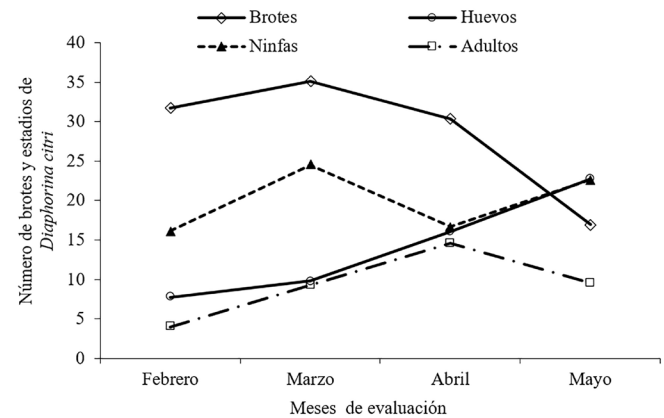


Figura 3. Número promedio de los diferentes estadios de *Diaphorina citri* y de brotes vegetativos según época de muestreo.

Los insecticidas más utilizados para el control de *D. citri* en los cuatros viveros fueron BIODie® (extracto de berberina, ricina, argemonina, terthienyl), Tigre® 25 EC (dimetoato + cipermetrina), Abamectina® 1.8 % EC y Cipermetrina® 25 EC (cipermetrina). Entre estos insecticidas, el más utilizado fue BIODie con un 80 % de uso. En los viveros donde se realizó una mayor cantidad de aplicaciones, las poblaciones de *D. citri* fueron más bajas. En los viveros El Diamante y Campos Azules 2, se realizaron 16 aplicaciones,

CIENCIA DE LAS PLANTAS

coincidiendo con la baja presencia de *D. citri* (5 y 7 adultos respectivamente); seguido por el vivero El Román con ocho aplicaciones y un promedio de 15 capturas y en menor frecuencia el vivero Campos Azules 1 con seis aplicaciones y un total de 11 adultos capturados (Figura 4).

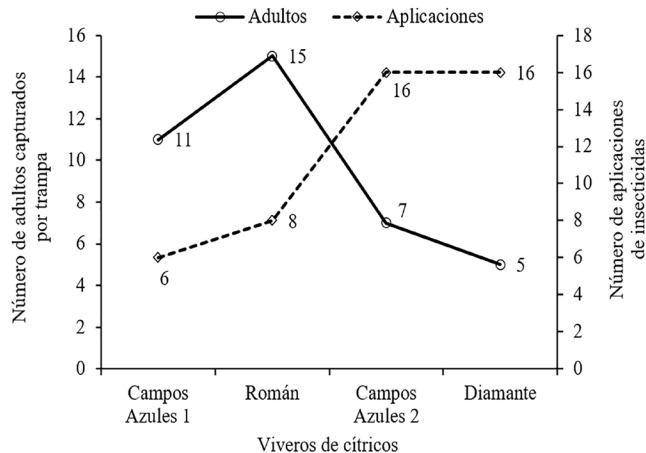


Figura 4. Comparación del número de aplicaciones de insecticidas y el número total de adultos capturados por trampa en los viveros en estudio.

En los últimos años se han propuesto estrategias para controlar a *D. citri*, sin embargo, el control químico es el método que ha mantenido más bajas las poblaciones del

insecto (Ruiz-Galván *et al.*, 2015). El control químico se dirige principalmente hacia el vivero, plantaciones de fomento y plantaciones jóvenes, puesto que los árboles maduros soportan mejor los daños causados por el vector (Alemán *et al.*, 2007). En los viveros donde se realizó una mayor cantidad de aplicaciones, las poblaciones de *D. citri* fueron más bajas, por lo tanto, es notorio el efecto que tienen las aplicaciones de plaguicidas sobre la reducción en las poblaciones de *D. citri* (Figura 4). Sin embargo, el momento, la elección de los productos y los métodos de aplicación durante la temporada de crecimiento están lejos de ser estándar. Se deben tener en cuenta factores como la eficacia, la presión del vector, la disponibilidad de equipos, la conservación de insectos benéficos y el manejo de la resistencia (Qureshi *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* a través de la prueba de PCR en los cuatro viveros. La fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* por vivero fue variable a través del tiempo. Los picos poblacionales más altos se observaron en el mes de abril. No se encontró correlación estadística significativa entre los tres estadios del vector y el número de brotes vegetativos nuevos. En los viveros donde se realizó una mayor cantidad de aplicaciones de insecticidas químicos, las poblaciones de *Diaphorina citri* fueron más bajas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, K., Sijam, K., Hashim, H., Abdu, A., Rosli, Z. (2010). Assessment of Citrus susceptibility towards *Candidatus Liberibacter Asiaticus*-Terengganu isolate based on vector and graft transmission tests. *Journal of Agricultural Science*, 3(3), 159-166.
- Alemán, J, Baños, H., y Ravelo, J. (2007). *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. *Revista de Protección Vegetal*, 22(3), 154-165.
- Arredondo Valdés, R., Delgado Ortiz, J. C., Beltrán Beache, M., Anguiano Cabello, J., Cerna Chávez, E., Rodríguez Pagaza, Y. & Ochoa Fuentes, Y. M. (2016). A review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus. *Canadian Journal of Microbiology*, (62), 803-811.
- Boina, D. R. & Bloomquist, J. R. (2015). Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Management Science*, (71), 808-823.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, (88), 7-37.
- Chávez-Medina, J. A., Flores-Zamora, L. F., Góngora-Gómez, A. M., Gómez Peraza, R. L. y Cristino Baruch García-Negroe, C. B. (2016). Distribución temporal de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en el municipio de Sinaloa, Sinaloa. *Entomología Mexicana*, (3), 324-329.
- Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu Jr., J., Machado, M. A., do Amaral, A. M. & Muller, G. W. (2004). First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, 88(12), 1382.
- Ding, F., Duan, Y., Paul, C., Bransky, R. H. & Hartung, J. S. (2015). Localization and distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus and periwinkle by Direct Tissue Blot Immuno Assay with an Anti-OmpA Polyclonal Antibody. *PLoS ONE*, 10(5): e0123939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123939>
- Ettxeberria, E., González, P., Dawson, W. & Spann, T. (2003). *An Iodine-Based Starch Test to Assist in Selecting Leaves for HLB Testing*; Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: Gainesville, FL, USA, 2003.

CIENCIA DE LAS PLANTAS

- Fujikawa, T. & Iwanami, T. (2012). Sensitive and robust detection of citrus greening (huanglongbing) bacterium “Candidatus Liberibacter asiaticus” by DNA amplification with new 16S rDNA specific primers. *Molecular and Cellular Probes*, 26(5), 194-197.
- García, Y., Ramos, Y. P., Sotelo, P. A. y Kondo, T. (2016). Biología de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) bajo condiciones de invernadero en Palmira, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 42(1), 36-42.
- Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, (48), 119-139.
- Hansen, A. K., Trumble, J. T., Stouthamer, R. & Paine, T. D. (2008). A new huanglongbing species, “Candidatus Liberibacter psyllaourous,” found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5862-5865. <https://doi.org/10.1128/AEM.01268-08>.
- Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J. M. & Garnier, M. (1999). Detection and identification of the two Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and Cellular Probes*, 13(5), 373-379.
- Hung, T. H., Wu, M. L. & Su, H. J. (1999). Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology*, 147(10), 599-604.
- Keremane, M. L., Ramadugu, C., Rodriguez, E., Kubota, R., Shibata, S., Hall, D. G. & Lee, R. F. (2015). A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop Protection*, 68(2015), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.026>
- Lee, J. A., Halbert, S. E., Dawson, W. O., Robertson, C. J., Keesling, J. E. & Singer, B. H. (2015). Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), 7605-7610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508253112>
- Leong, S. C. T., Abang, F., Beattie, G. A. C., Kueh, J. H. & Wong, S. K. (2011). Seasonal population dynamics of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama in Sarawak. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6, 536-543.
- Leong, S. S., Leong, S. C. T. & Beattie, G. A. C. (2022). Integrated Pest Management Strategies for Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and Huanglongbing in Citrus for Sarawak, East Malaysia, Borneo. *Insects*, 13, 960. <https://doi.org/10.3390/insects13100960>
- Li, W., Hartung, J.S. & Levy, L. (2007). Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of “Candidatus Liberibacter species” associated with citrus huanglongbing. *Plant Disease*, (91), 51-58.
- Luo, L., Gao, S., Ge, Y. & Luo, Y. (2017). *Transmission dynamics of a huanglongbing model with cross protection. Advances in Difference Equations*, 1:355. <https://doi.org/10.1186/s13662-017-1392-y>.
- Merfá, M. V., Pérez-López, E., Naranjo, E., Jain, M., Gabriel, D. W. & De La Fuente, L. (2019) Progress and obstacles in culturing ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’, the bacterium associated with Huanglongbing. *Phytopathology*, 109, 1092-1101.
- Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, A., Ramírez-Reyes, A. J. y Mendoza-García, E. E. (2013). Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazonas, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(2), 317-333.
- Qureshi, J. A., Kostyk, B. C. & Stansly, P. A. (2014). Insecticidal suppression of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of Huanglongbing pathogens. *PLoS ONE* 9(12): e112331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112331>.
- Ruiz-Galván, I., Bautista-Martínez, N., Sánchez-Arroyo, H. y Valenzuela Escoboz, F. A. (2015). Control Químico de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) en Lima Persa. *Acta Zoológica Mexicana*, 31(1), 41-47.
- Ukuda-Hosokawa, R., Sadoyama, Y. & Kishaba, M. (2015). Infection density dynamics of the citrus greening bacterium “Candidatus Liberibacter asiaticus” in field populations of the psyllid *Diaphorina citri* and its relevance to the efficiency of pathogen transmission to citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3728-3736. <https://doi.org/10.1128/AEM.00707-15>
- Wang, N. (2020). A perspective of citrus Huanglongbing in the context of the Mediterranean Basin. *Journal of Plant Pathology*, 102, 635-640. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00555-w>
- Yzquierdo-Alvarez, M. E., Ortiz-García, C. F. & Rincón-Ramírez, J. A. (2021). Detection of huanglongbing of citrus (Citrus sp.) through Sentinel-2satellite images in Huimanguillo, Tabasco, Mexico. *Agro Productividad*, 14(12), 119-126. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i12.2053>